



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

THIAGO CAPOZZI MONTALVÃO

Avaliação de um método de descongelamento de sêmen bovino para facilitar o emprego da Inseminação Artificial nas pequenas propriedades rurais

**Monografia para conclusão do Curso de
Medicina Veterinária da Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília - UnB**

Brasília DF

2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

THIAGO CAPOZZI MONTALVÃO

Avaliação de um método de descongelamento de sêmen bovino para facilitar o emprego da
Inseminação Artificial nas pequenas propriedades rurais

Monografia para a conclusão do Curso de Medicina
Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária da Universidade de Brasília

Orientador:
Prof. Dr. Ivo Pivato

Brasília DF
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

MONTALVÃO, Thiago Capozzi

Avaliação de um método de descongelamento de sêmen bovino para facilitar o emprego da Inseminação Artificial nas pequenas propriedades rurais/ Thiago Capozzi Montalvão, orientação de Ivo Pivato – Brasília 2013.

29 páginas

1. Inseminação. 2. Criopreservação. 3. Descongelamento

Cessão de Direitos

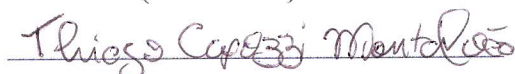
Nome do Autor: Thiago Capozzi Montalvão

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Avaliação de um método de descongelamento de sêmen bovino para facilitar o emprego da Inseminação Artificial nas pequenas propriedades rurais.

Ano: 2013

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

(Assinatura)



Thiago Capozzi Montalvão

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: MONTALVÃO, Thiago Capozzi

Título: Avaliação de um método de descongelamento de sêmen bovino para facilitar o emprego da inseminação artificial nas pequenas propriedades rurais.

Monografia apresentada para conclusão do curso
de Medicina Veterinária da Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília

Aprovado em: 12/12/2013

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ivo Pivato (Orientador)

Instituição: FAV / UnB

Julgamento: APROVADO

Assinatura: 

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

Instituição: FAV / UnB

Julgamento: Aprovado

Assinatura: 

Dr. Carlos Frederico Martins

Instituição: Embrapa Cerrados

Julgamento: Aprovado

Assinatura: 

DEDICATÓRIA

*Aos meus avós Rony
Gilda Capozzi e Waldemar
Montalvão que não estão
mais aqui para compartilhar
desta conquista comigo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Mônica Capozzi e Walmir Montalvão, pelo suporte e sábios conselhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ivo Pivato, pela confiança em mim depositada e contribuições ao meu trabalho.

Aos responsáveis pelo Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Centro Nacional de Recurso Genéticos – CENARGEN – pela contribuição na realização do experimento.

Aos meus amigos da veterinária, em especial, Gabriel Batista de Oliveira Borges, Luis Carlos Pires Rayol Filho, João Paulo Barbosa, Geórgia Dantas Roriz, Gabriela Dal Sasso de Oliveira, Letícia Goulart Desordi, Aline Brito Medeiros, Adriana Modesto, Diego Barnabé Carneiro, Caio Ítalo Santiago Luongo, Rafael Martin Moreira Maques e Camilla Fagundes Becon, pelas boas memórias e experiências vividas no decorrer do curso.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH:	Amplitude do deslocamento leteral de cabeça
BCF:	Frequência de batimento flagelar cruzado
CASA:	Análise espermática auxiliada por computador
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
FITC:	Isotiocinato de Fluoresceína
ICRA:	Membrana Plasmática Íntegra e Acrossoma Reagido
IP:	Iodeto de Propídeo
ISRA:	Membrana Plasmática Íntegra e Acrossoma Não Reagido
LCRA:	Membrana Plasmática Lesada e Acrossoma Reagido
LIN:	Linearidade
LSRA:	Membrana Plasmática Lesada e Acrossoma Não Reagido
PNA:	Aglutinina do amendoim
STR:	Retilinearidade
VAP:	Velocidade media da trajetória
VCL:	Velocidade curvilínea
VSL:	Velocidade linear progressiva

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	9
1.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E MANIPULAÇÃO DE SÊMEN	9
1.2 CASA	13
1.3 INTEGRIDADE DE MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL.....	17
2. ARTIGO CIENTÍFICO	18
2.1. INTRODUÇÃO.....	18
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
2.4. CONCLUSÃO	27
3. REFERÊNCIAS.....	27

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E MANIPULAÇÃO DE SÊMEN

A crescente demanda por alimentos em todo o mundo faz com que diversas pesquisas sejam realizadas em torno da produtividade agrícola. Somando isso ao pequeno espaço físico que muitos países dispõem para a agricultura, diversos são os esforços para que haja um aumento da eficiência produtiva.

A proteína animal é, sem dúvida, uma fonte de alimento nobre e muito apreciada em todo o mundo. Atualmente exige-se que os animais sejam abatidos cada vez mais cedo e tenham uma eficiência reprodutiva cada vez maior, ou seja, se tornem geneticamente superiores. Assim sendo, ferramentas de multiplicação de genética, como a inseminação artificial e a fertilização *in vitro*, estão sendo cada vez mais utilizadas por produtores rurais.

A inseminação artificial foi a primeira das biotecnologias da reprodução a ser desenvolvida e, ainda hoje, é a mais utilizada. Especula-se que a esta tenha sido utilizada pela primeira vez em meados da década de 1330 por árabes. Contudo, o primeiro registro oficial data de 1784 quando o monge italiano Lázaro Spallanzani demonstrou na espécie canina ser possível a fecundação da fêmea sem o contato direto de um macho, obtendo assim o nascimento de três filhotes e marcando o início de uma revolução no campo da reprodução animal (ASBIA, 2012).

Em 1934 a vagina artificial e o manequim para bovinos foram desenvolvidos por pesquisadores russos. Em 1936 veterinários dinamarqueses desenvolveram a técnica da fixação retal da cérvix, o que possibilitou a deposição intra-uterina do sêmen. Estes também desenvolveram, durante a década de 1940, a palheta para envase de sêmen, que mais tarde naquela mesma década viria a ser produzida em escala comercial na França (BARBOSA, 2008).

No ano de 1949 pesquisadores ingleses demonstraram que o espermatozoide poderia ser conservado por um longo tempo a temperaturas de -196°C (nitrogênio líquido) graças à adição de glicerol ao meio diluente, ajudando a difundir esta técnica ainda mais. Até então o sêmen de algumas espécies, quando refrigerado a 5°C , tinha uma sobrevivência de no máximo 5 dias (BARBOSA, 2008).

Diversos são os benefícios da inseminação artificial em relação à monta natural. Economicamente é mais viável a compra de sêmen do que a compra e manutenção de touros geneticamente provados em uma propriedade. Um touro comprado por US\$ 2.000,00 e com

um custo médio de manutenção de US\$ 500,00 anuais gera, ao longo de seus seis anos de produção, um custo de US\$ 5000,00. Se este touro produzir 100 bezerros durante a sua vida o custo médio de cada bezerro será de US\$ 50,00, muito alto em relação ao preço médio de um bezerro ao desmame, que é em torno de US\$ 380,00 (FERRAZ et al., 2013). Com o preço médio de uma dose de sêmen no Brasil de aproximadamente US\$ 5,13 (COSTA, 2006) e uma média de 1,8 inseminação/vaca o custo por bezerro é de US\$ 9,25.

Em relação à sanidade animal, a inseminação artificial reduz o risco da transmissão de doenças venéreas, como triconomose, campilobacteriose, brucelose, vulvovaginite/balanopostite pustular infecciosa, entre outras. Também evita lesões que podem ocorrer durante a monta natural tanto em machos quanto em fêmeas (NASCIMENTO, 2008).

Do ponto de vista zootécnico, a inseminação artificial é importante ferramenta para o melhoramento genético. Enquanto um touro provado geneticamente produziria não muito mais que 100 bezerros durante sua vida produtiva (FERRAZ et al. 2013), esse número, com a inseminação artificial, aumenta substancialmente, podendo chegar a milhares de bezerros.

Nos últimos anos, graças a avanços tecnológicos e a um melhor conhecimento da fisiologia reprodutiva das fêmeas, tem-se empregado a inseminação artificial em tempo fixo. Isto se resume à pré-determinação de quando um lote de vacas apresentará cio ao se empregar hormônios exógenos, como progestágenos, estrógenos e prostaglandinas (MARCUSSE, 2006). Dessa forma é possível inseminar um grande número de fêmeas em um curto período de tempo, reduzindo-se o tempo de uma estação de monta e as falhas na detecção de cio, e otimizando o manejo reprodutivo nas propriedades. Assim, grandes propriedades que possuem milhares de matrizes e onde a inseminação artificial convencional com detecção de cio seria inviável, podem utilizar desta biotécnica como alternativa a monta natural

Contudo a maior parte do sêmen de espécies como a bovina é comercializado congelado e o estresse que este sofre durante os processos de congelamento e descongelamento pode reduzir significativamente sua viabilidade (BAILEY, 2000). Diversas foram as pesquisas e melhorias nesta biotecnologia da reprodução desde seu surgimento. Entretanto para que haja um aumento mais expressivo na eficiência da reprodução animal, mais avanços ainda são necessários.

Os danos sofridos por espermatozoides durante os processos de congelamento e descongelamento são físicos e bioquímicos. Espermatozoides podem continuar móveis mesmo estando com as membranas lesadas após o descongelamento, o que pode comprometer a sua capacidade de fertilização. Segundo TARESSON et al. (1977) citado por GONZALEZ

(2004) a motilidade é mais bem preservada que a integridade acrossomal em uma amostra de sêmen congelado. Sabe-se que é necessário um grande número de espermatozoides com acrossoma funcional para que haja penetração na zona pelúcida e fertilização do ovócito.

Os maiores danos durante o processo de congelamento ocorrem sobre as membranas celulares, sendo que, no espermatozoide, podem ser citadas três: acrossomal, plasmática e mitocondrial. A estrutura destas segue o modelo clássico das membranas celulares, com uma bicamada fosfolipídica associada colesterol e proteínas transmembrana. Para que desempenhem corretamente suas funções, as membranas necessitam estar em um estado de fluidez. Este é afetado pela composição das membranas e pela temperatura a que são expostas (GONZALEZ, 2004).

Em relação à composição, a concentração de colesterol na membrana celular é diretamente proporcional à sua resistência ao congelamento. Este está presente em baixas concentrações nos espermatozoides de touros e carneiros, o que torna essas espécies sensíveis ao congelamento (GONZALEZ, 2004).

Espécies reativas de oxigênio (radicais livres) têm suas concentrações substancialmente aumentadas durante o resfriamento de sêmen. São produzidas tanto por espermatozoides quanto por leucócitos presentes no sêmen, e têm o potencial de causar danos oxidativos às membranas celulares. A diminuição da atividade da enzima superóxido dismutase (importante antioxidante) durante o resfriamento do sêmen foi relatada em touros e humanos e pode ser importante fator no aumento destes radicais livres. Sendo assim, a relação entre ácidos graxos insaturados e saturados na membrana plasmática é outro fator de sensibilidade ao congelamento, pois os ácidos graxos insaturados são mais suscetíveis a danos oxidativos como a peroxidação lipídica. As membranas celulares dos espermatozoides de espécies sensíveis ao congelamento, como a bovina e a ovina, possuem uma concentração duas vezes maior de ácidos graxos insaturados em relação aos saturados (BAILEY, 2000).

A diminuição da temperatura durante o congelamento produz mudanças físicas nas membranas, passando-as do estado líquido para um estado semelhante a um gel. Assim, esta se torna rígida, suscetível a rupturas e permeável a íons. Para contornar este problema o congelamento é executado seguindo-se curvas *tempo × temperatura*, que são específicas para cada espécie. Na espécie bovina, as maiores mudanças no estado da membrana ocorrem entre 5 e 15°C (GONZALEZ, 2004).

Outra importante fonte de lesões na célula espermática durante o congelamento é a formação de cristais de gelo em seu interior. Para diminuir esses danos, utilizam-se como crioprotetores uma série de substâncias de alto peso molecular como lipoproteínas da gema de

ovo, açúcares e proteínas do leite (GONZALEZ, 2004). Estes não penetram o espermatozoide (crioprotetores não penetrantes), sendo responsáveis por um aumento na osmolaridade extracelular, desidratando as células e diminuindo a formação dos cristais de gelo intracelulares.

Existem também os crioprotetores penetrantes, que são substâncias de baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e pouca toxicidade celular. Sua principal função é proteger a célula de danos causados por aumentos nas concentrações de solutos no meio intracelular. Possuem estruturas que permitem ligar-se ao hidrogênio nas moléculas de água, reduzindo assim a formação de cristais de gelo e diminuindo a concentração de solutos tanto nos meios intra como extracelular. Os crioprotetores penetrantes também preservam a estrutura quaternária das proteínas de membrana, tornando-as mais estáveis frente à desidratação (GONZALES, 2004).

Diversos são os crioprotetores penetrantes utilizados em congelamento de sêmen. Substâncias como glicerol, propilenoglicol, etilenoglicol, metanol, acetamida, formamida e dimetilsulfóxido podem ser citados. O glicerol foi o primeiro a ser descoberto e é largamente utilizado na espécie bovina (BAILEY, 2000). Este é um álcool que possui três grupos hidroxila capazes de ligar-se a hidrogênio nas moléculas de água. Contudo sua concentração como crioprotetor é limitada pela toxicidade. Esta depende de fatores como taxa de resfriamento, composição total do diluidor e velocidade do congelamento. À temperatura ambiente este é bastante tóxico (GONZALES, 2004).

Estudo realizado por STROUD (2012) mostra que as centrais de inseminação artificial processam e congelam sêmen de forma adequada. Reduções na viabilidade de sêmen criopreservado para índices abaixo dos esperados ocorrem, normalmente, por manipulação inadequada deste pelos inseminadores. Diversas são as recomendações para a realização de inseminação artificial com sêmen criopreservado. Estas vão desde o momento da coleta das palhetas dentro do botijão, passando pelas forma e temperatura de descongelamento destas, até a deposição do sêmen nelas contido dentro do aparelho reprodutivo das fêmeas.

Durante a manipulação de sêmen criopreservado, vários são os pontos onde pode haver choque térmico de forma não só a diminuir a qualidade deste, como também inviabilizá-lo. A elevação do canister onde se localizam as palhetas de sêmen acima da “linha de congelamento” do botijão de nitrogênio pode elevar significativamente a temperatura destas. Segundo BERNDSTON (1977), tempos de exposição não maiores que 10 segundos de uma palheta com 0,5 ml acima da “linha de congelamento”, onde ainda existe vapor de nitrogênio, elevam sua a temperatura de -190°C para -100°C. Para palhetas com 0,25 ml este

aumento é ainda maior, chegando à temperatura de -75°C . A temperatura crítica para a formação de cristais de gelo é -130°C , e uma vez alcançada o sêmen não deve ser resfriado novamente.

Após ser retirada do botijão, a palheta de sêmen deve, o mais rapidamente possível, ser descongelada por imersão em água a uma temperatura entre 35°C a 37°C durante 30 segundos. Entretanto MPHAPHATHI (2012) demonstrou que, para sêmen de galos da raça sul-africana Venda, este pode ser descongelado a uma temperatura de 5°C durante cinco minutos na geladeira, obtendo assim os melhores resultados quando comparando com temperaturas 25°C e 41°C . Em outro estudo, KACZYK (2011) comparou o descongelamento de sêmen da forma tradicional (37°C por 30 segundos) com descongelamento realizado diretamente dentro da cérvix de vacas, com a palheta sendo, imediatamente após retirada do botijão, montada no aplicador, obtendo índices de concepção e motilidade similares aos do descongelamento tradicional.

1.2 CASA

Os primeiros aparelhos CASA foram desenvolvidos em meados dos anos 1980 e, na época foi sugerido que substituiriam os laboratórios de andrologia. Contudo não foi o que aconteceu, pois os primeiros aparelhos não apresentavam resultados confiáveis (MATOS, 2008).

Os componentes básicos do CASA são um microscópio (campo escuro ou contraste de fase) e uma câmera acoplados a um computador. As imagens obtidas pela câmera são digitalizadas e o computador identifica cada espermatozoide através da sobreposição, por cada uma de suas cabeças, de um certo número de pixels da imagem. Esse número deve estar dentro de um intervalo de pré-determinado para cada espécie cujo sêmen está sendo analisado. Contudo isso pode gerar erros, pois debris e sujidades na amostra podem ser contadas como células. Após ser identificada, cada célula tem sua posição definida através de coordenadas sobre um plano cartesiano (x,y) (MORTIMER, 2000). A Figura 1 mostra a identificação e a localização de uma célula espermática sobre o plano cartesiano.

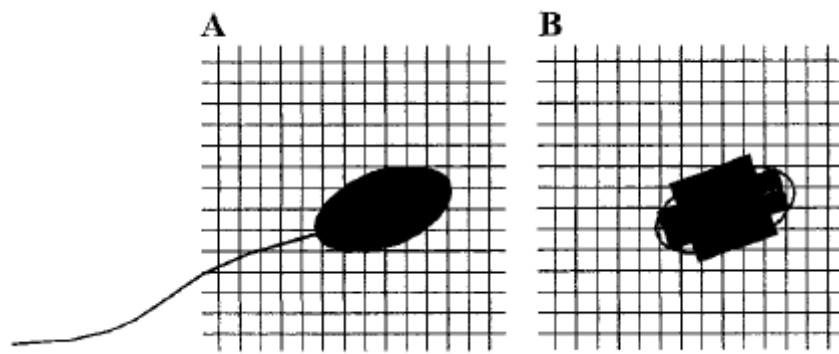


Figura 1 – Célula espermática representada no plano cartesiano

Fonte: MORTIMER, 2000

Cada quadro gerado pela câmera, variando de 25 a 60 quadros por segundo, gera uma nova imagem onde cada célula tem sua posição novamente determinada. Para identificar cada célula a cada quadro, o computador procura pela imagem consecutiva destas dentro de uma zona de probabilidade. Esta zona é uma circunferência e tem seu raio determinado pela máxima distância esperada a ser percorrida por cada célula a cada quadro. Tal zona pode sofrer variações de acordo com a espécie que está sendo analisada, ou se os espermatozoides estão em sêmen ou em meios de cultura. Este método, contudo, está sujeito a erros, pois quando uma amostra é muito concentrada, duas ou mais células podem estar dentro de uma zona de probabilidade, o que torna a análise menos confiável. Assim sendo, é recomendado que as amostras estejam em uma concentração abaixo de $40 \times 10^6/\text{ml}$ (MORTIMER, 2000). A Figura 2 ilustra a zona de probabilidade e possíveis erros na identificação de células espermáticas.

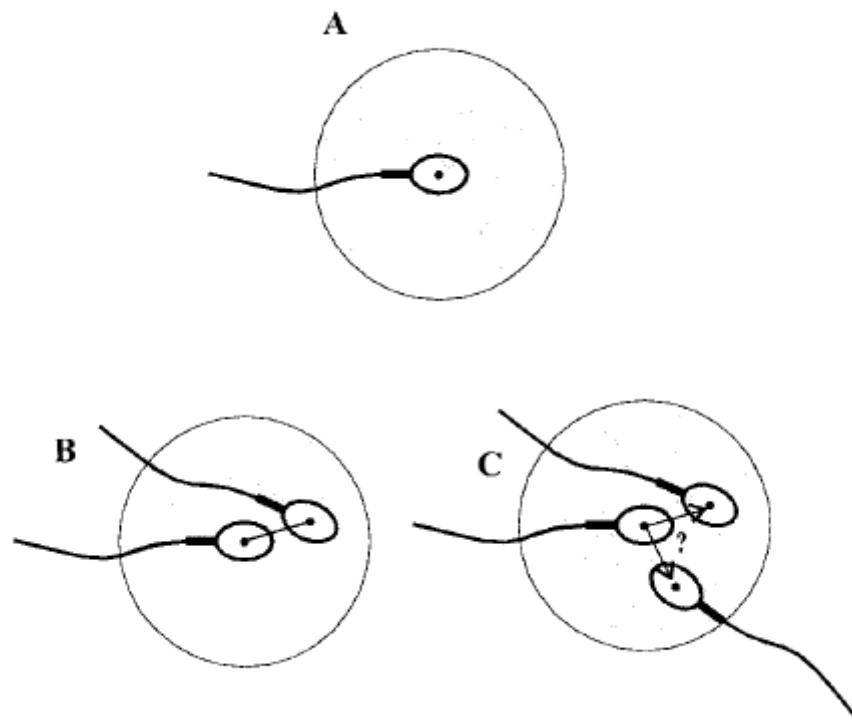


Figura 2 – Zona de probabilidade

Fonte: MORTIMER, 2000

Após a série de imagens ser processada, e cada célula ter todas as suas coordenadas registradas ao longo do tempo, o computador pode determinar as motilidades total e progressiva, as velocidades (VCL, VAP, VSL), os padrões de movimento, e uma série de outros parâmetros (MATOS, 2008).

Cada um dos três valores das velocidades tem um diferente significado. VCL refere-se à distância total percorrida pela célula e é sempre o maior dos três valores. VSL refere-se a distância, entre o primeiro e o último ponto, percorrida pela célula e é sempre a menor das três velocidades. VAP é a distância percorrida pelo espermatozoide no caminho médio percorrido. Quando o espermatozoide tem uma trajetória mais retilínea, os valores de VAP e VSL são próximos. Contudo, quando a trajetória é não linear, o valor de VAP tende a ser significativamente maior que o valor de VSL. Os valores dessas medidas de velocidades são expressos em $\mu\text{m/s}$ (MORTIMER, 2000). A figura 3 ilustra a relação entre as três velocidades em trajetórias regular, curvada e de elevada amplitude.

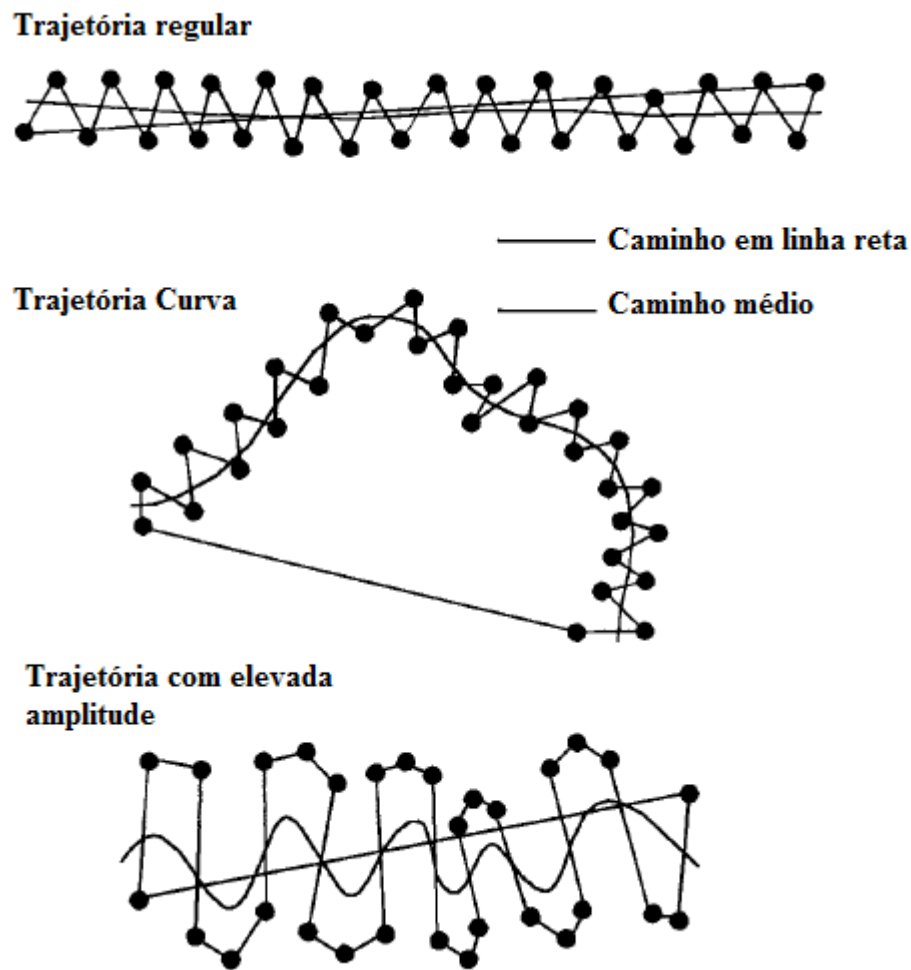


Figura 3 – Relações entre as velocidades

Fonte: MORTIMER, 2000 – com adaptações

Pelo fato de as trajetórias influenciarem as velocidades, esses valores são comparados, gerando parâmetros como STR e LIN, obtidos, respectivamente, através de $(VSL/VAP) \times 100$ e $(VSL/VCL) \times 100$. Ambos são expressos em porcentagem e estimam a relação dos percursos dos espermatozoides com linhas retas, de forma que, quanto mais o trajeto se afasta de uma linha reta, menor será seu valor LIN (MORTIMER 2000).

Outros parâmetros também avaliados são ALH e BCF. A amplitude de deslocamento médio da cabeça (ALH) está diretamente relacionada com a capacidade de o espermatozoide penetrar a zona pelúcida do ovócito, tendo efeito, consequentemente, sobre a fertilização (MATOS, 2008). BCF reflete o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento em um segundo, sendo expresso em Hertz (Hz).

1.3 INTEGRIDADE DE MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL

Os espermatozoides, após adentrarem o trato reprodutivo feminino, sofrem diversos processos como capacitação e hiperativação. Contudo, para que consiga fecundar o ovócito, este deve passar por outra importante etapa, a reação acrossomal, que é fundamental para que o espermatozoide consiga ultrapassar a zona pelúcida e se fundir ao oolema. Para tanto é essencial um acrossoma íntegro e funcional, que deve iniciar sua reação apenas quando entrar em contato com a zona pelúcida do ovócito, mais precisamente com uma glicoproteína denominada ZP3 (NETO, 2010).

Diversas técnicas são usadas com o propósito de avaliar o percentual de células com acrossoma íntegro em uma amostra de sêmen, dentre as quais podem ser citadas dupla coloração com azul de tripan e Giemsa, técnicas de fluorescência e anticorpos antiacrosina (NETO, 2010).

Algumas técnicas de fluorescência utilizam lecitinas (PNA) conjugadas a fluoresceínas (FITC). Peanut Agglutinin (PNA), uma lecitina produzida pela planta *Arachis hypogaea*, é recomendada para avaliação de sêmen da espécie bovina. Esta liga-se a carboidratos como manose, galactose, N-acetilglucosamina, específicos de glicoproteínas exclusivas do acrossoma. O acrossoma íntegro, não é permeável para tais lecitinas, que só se ligam a acrossomas reagidos ou danificados. Quando conjugadas a uma fluoresceína (isoticionato de fluoresceína), podem ser detectadas por microscopia de epifluorescência (CARVALHO, 2009).

Associado ao conjugado PNA/FITC, utiliza-se também um fluorocromo com alta afinidade por DNA, o iodeto de propídeo (IP). A membrana plasmática íntegra, contudo, é impermeável a este corante, tornando-se permeável quando danificada e permitindo sua ligação ao DNA espermático, indicando, assim, espermatozoides mortos (NETO, 2010). A Figura 4 ilustra a visualização da mesma imagem em contraste de fase (1) e epifluorescência (2). O espermatozoide “A” está com a membrana plasmática e o acrossoma íntegros. O espermatozoide “B” está com a membrana plasmática lesada (cora-se em vermelho) e o acrossoma reagido (cora-se em verde).

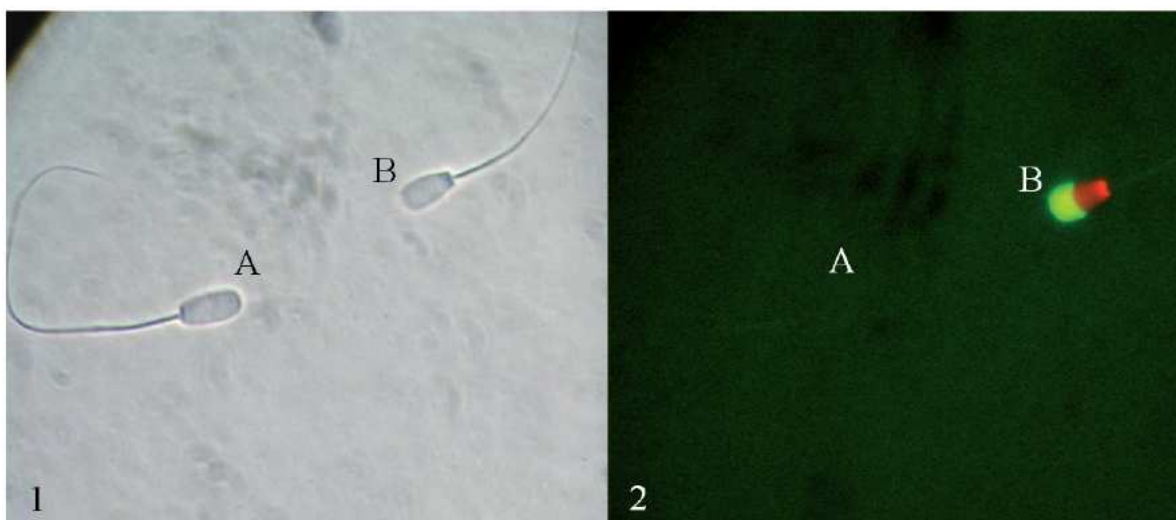


Figura 4 – Microscopia de contraste de fase (1) e epifluorescência (2), em aumento de 40×

Fonte: NETO, 2010

2. ARTIGO CIENTÍFICO

2.1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país de dimensões continentais, que possui grandes diversidades, desde o ponto de vista climático até grandes diferenças culturais. Isso pode ser observado também na utilização das propriedades rurais pelos brasileiros, que vão desde áreas com menos de um hectare, onde é produzido apenas para subsistência, até grandes áreas maiores que 100.000 hectares (INCRA, 2012), onde são aplicadas as mais modernas tecnologias de produção caracterizando-se uma verdadeira agroindústria.

O número total de propriedades segundo apuração realizada pelo INCRA em 2012, é de 5.498.505, com uma área total de 605.387.746,06 hectares. Destas, 4.397.902, aproximadamente 80% são caracterizadas como sendo de agricultura familiar, que muitas vezes não têm acesso a simples tecnologias que poderiam melhorar muito seus índices de produção.

Exemplo destas tecnologias pouco utilizadas é a inseminação artificial, biotécnica da reprodução relativamente simples e extremamente difundida em alguns países considerados desenvolvidos, que já em 1991 a utilizavam quase na totalidade de seus plantéis em idade reprodutiva. Nesse ano o Japão inseminou 95,7% de suas fêmeas, a República Tcheca 87%, a Austrália 73,9%, a Itália 66,2% (BARBOSA, 2008).

No Brasil, a inseminação artificial ainda é pouco difundida. Segundo dados da ASBIA, foram comercializadas 12.340.321 doses de sêmen em 2012. Apesar de haver uma grande evolução com relação a anos anteriores – em 2008 foram 7.460.959 –, esses números ainda são baixos quando se estima que existam aproximadamente 70 milhões de matrizes em idade reprodutiva no país (FERRAZ et al., 2013). Com uma média de 1,8 doses por vaca, apenas 9,79% do total de fêmeas foi inseminado em 2012.

Diversos podem ser os motivos para essa baixa difusão da inseminação artificial no Brasil. A falta de conhecimento da técnica por parte dos produtores rurais é, sem dúvida, uma das mais importantes. Contudo, as grandes dimensões do país possibilitam que haja uma grande diversidade nos tipos de propriedades rurais. Existe assim um grande contraste entre propriedades com as mais diversas tecnologias empregadas e pequenas propriedades de subsistência, para onde o acesso é muitas vezes bastante complicado e que, às vezes, não dispõem nem de eletricidade. A aquisição e a manutenção de um botijão de sêmen podem ser onerosas e inviáveis para esses pequenos produtores. Entretanto, isso pode ser contornado com o uso de um botijão comunitário em uma associação de produtores. O transporte desse sêmen até as propriedades pode, entretanto, se tornar complicado visto que seria necessário o transporte do botijão. Assim sendo, o objetivo deste trabalho é avaliar o descongelamento de sêmen sob temperaturas de 4°C e de 37°C, e suas respectivas viabilidades ao longo do tempo. Desse modo, após o sêmen ser descongelado, pode ser transportado imerso em água dentro de garrafas térmicas, uma alternativa ao seu transporte imerso em nitrogênio líquido.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 60 amostras de sêmen comercial de touros de três raças diferentes, 20 de Red Angus, 20 de Nelore e 20 de Girolando, congeladas em palhetas de 0,5ml e mantidas em botijão criogênico. As amostras foram submetidas a dois tratamentos, sendo metade descongelada a 37°C (controle) e a outra metade a 4°C, e analisadas quanto a sua viabilidade ao longo do tempo. O processo consistiu em descongelar dez amostras ao mesmo tempo, cinco em cada temperatura. Cada amostra foi analisada em um momento diferente, sendo a primeira no momento do descongelamento e as outras quatro sucessivamente entre uma e quatro horas pós-descongelamento, uma a cada hora. Para cada amostra foi realizada uma réplica.

Os testes foram realizados no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa CENARGEN, através aparelho de avaliação computadorizada CASA (computer-aided sperm

analysis, IVOS II Hamilton Thorne) e avaliação de integridade de membranas plasmática e acrossomal pela microscopia de fluorescência utilizando lecitinas conjugadas a fluoresceínas e a um fluorocromo (PNA/FITC/IP). O experimento foi realizado nos períodos entre 19 e 20 de dezembro de 2012 e 3 e 6 de setembro de 2013.

As palhetas de sêmen eram deixadas intactas imersas em água para cada uma dos tratamentos. No momento da avaliação estas eram secas em papel toalha e seu conteúdo aliqotado em tubos de micro-centrífuga de 1,5 ml. Com o auxílio de pipetas, o volume de 10 μ l de sêmen era colocado sobre a lâmina do aparelho CASA, que já estava pré-aquecida a 37°C, e então avaliado. Para avaliações das integridades de membranas plasmática e acrossomal foram seguidas as recomendações de NETO & DODE (2010).

Para a análise estatística dos resultados, consideraram-se duas populações, das quais não se tinha informações a respeito de suas distribuições, mas sabia-se que as variáveis envolvidas tinham uma escala de medida pelo menos ordinal. Do experimento obtiveram-se duas amostras independentes das duas populações. Testou-se se suas distribuições foram iguais em localização, isto é, foi avaliado se uma população tendeu a ter valores maiores do que a outra. Empregou-se o *teste não paramétrico de Mann-Whitney* com nível de significância de 95% (α bicaudal: 0,05) para a análise dessas duas amostras independentes extraídas de populações consideradas como possuindo médias iguais. Esse teste é uma importante alternativa ao teste paramétrico de comparação de médias pelo fato de não exigir considerações sobre as distribuições populacionais e suas variâncias. É baseado nos *postos* dos valores obtidos combinando-se as duas amostras, o que é feito ordenando-se esses valores, do menor para o maior, independentemente de a qual população cada valor provenha.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises das amostras de sêmen do animal da raça Red Angus encontram-se nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Resultados (α bicaudal: 0,05) obtidos pelo sistema CASA (computer-aided sperm analysis, IVOS II Hamilton Thorne) comparando a cinética de amostras de sêmen do touro da raça Red Angus, descongeladas sob temperaturas de 4°C e 37°C, nos momentos imediato, 1, 2, 3 e 4 horas após respectivos descongelamentos.

Parâmetros	Descongelamento a	Imediato		Após 1 hora		Após 2 horas		Após 3 horas		Após 4 horas		$Z_{cal} = \frac{\mu - \mu(u)}{\sigma(u)}$
		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	
ALH (μm)	4 C	7,1	7,2	7,1	6,8	7,7	5,7	6,7	6,9	7,3	6,7	0,23
	37 C	6,9	6,2	7,2	6,2	7,2	7,0	6,3	7,7	7,9	5,4	
BCF (Hz)	4 C	25,0	24,2	28,2	23,2	25,4	25,8	22,3	23,3	23,5	20,4	1,36
	37 C	31,4	32,4	31,2	32,4	25,1	27,3	20,4	23,5	25,3	20,1	
LIN (%)	4 C	47,0	44,0	51,0	49,0	47,0	50,0	51,0	50,0	48,0	48,0	0,68
	37 C	53,0	56,0	47,0	56,0	43,0	48,0	48,0	38,0	44,0	44,0	
MOTILIDADE (%)	4 C	59,0	41,0	53,0	39,0	41,0	42,0	37,0	37,0	59,0	40,0	0,00
	37 C	54,0	59,0	53,0	59,0	51,0	47,0	35,0	32,0	39,0	35,0	
MOTILIDADE PROGRESSIVA (%)	4 C	42,0	28,0	42,0	27,0	30,0	27,0	29,0	29,0	47,0	27,0	0,57
	37 C	41,0	45,0	36,0	45,0	28,0	34,0	23,0	16,0	19,0	14,0	
STR (%)	4 C	81,0	78,0	85,0	81,0	80,0	84,0	86,0	83,0	83,0	82,0	1,36
	37 C	85,0	87,0	76,0	87,0	72,0	81,0	78,0	68,0	71,0	71,0	
VAP ($\mu\text{m/s}$)	4 C	83,8	82,2	90,5	77,6	85,0	67,2	72,1	80,5	78,1	69,5	2,88a
	37 C	91,8	88,2	111,5	88,2	100,7	87,1	86,7	91,3	89,4	77,1	
VCL ($\mu\text{m/s}$)	4 C	151,3	151,5	154,2	138,2	153,2	116,6	124,9	141,8	141,7	124,2	2,08
	37 C	153,2	144,9	188,8	144,9	177,1	151,8	146,9	167,2	155,5	130,9	
VSL ($\mu\text{m/s}$)	4 C	67,7	63,5	76,8	63,1	69,0	56,6	62,8	67,4	65,0	57,2	1,36
	37 C	78,7	77,0	82,2	77,0	71,3	70,2	65,1	60,3	61,8	53,5	

a - 37°C superior (α bicaudal: 0,05)

b - 4°C superior (α bicaudal: 0,05)

Tabela 2 - Resultados (α bicaudal: 0,05) obtidos por microscopia de fluorescência (peanut agglutinin/isotiocinato de fluoresceína/iodeto de propídeo) comparando a integridade de membranas plasmática e acrossomal de espermatozoides de amostras de sêmen do touro da raça Red Angus, descongelados sob temperaturas de 4°C e 37°C, nos momentos imediato, 1, 2, 3 e 4 horas após respectivos descongelamentos.

Parâmetros	Descongelamento a	Imediato		Após 1 hora		Após 2 horas		Após 3 horas		Após 4 horas		$Z_{cal} = \frac{\mu - \mu(u)}{\sigma(u)}$
		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	
ICRA (%)	4 C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	37 C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
ISRA (%)	4 C	13,00	35,00	20,00	27,00	27,00	41,00	30,00	38,00	22,00	25,00	0,27
	37 C	20,00	39,00	10,00	23,00	12,00	56,00	27,00	25,00	38,00	29,00	
LCRA (%)	4 C	50,00	30,00	49,00	32,00	49,00	26,00	36,00	46,00	50,00	51,00	1,33
	37 C	56,00	33,00	55,00	50,00	65,00	23,00	52,00	40,00	46,00	50,00	
LSRA (%)	4 C	37,00	35,00	31,00	41,00	24,00	33,00	34,00	16,00	28,00	24,00	1,67
	37 C	24,00	28,00	35,00	27,00	23,00	21,00	21,00	35,00	16,00	21,00	

a - 37°C Superior (α bicaudal: 0,05)

b - 4°C Superior (α bicaudal: 0,05)

Houve diferença significativa (α bicaudal: 0,05) apenas no parâmetro VAP, sendo o descongelamento a 37°C superior.

Os resultados das análises das amostras de sêmen do animal da raça Girolando encontram-se nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Resultados (α bicaudal: 0,05) obtidos pelo sistema CASA (computer-aided sperm analysis, IVOS II Hamilton Thorne) comparando a cinética de amostras de sêmen do touro da raça Girolando, descongeladas sob temperaturas de 4°C e 37°C, nos momentos imediato, 1, 2, 3 e 4 horas após respectivos descongelamentos.

Parâmetros	Descongelamento a	Imediato		Após 1 hora		Após 2 horas		Após 3 horas		Após 4 horas		$Z_{cal} = \frac{\mu - \mu(u)}{\sigma(u)}$
		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	
ALH (μm)	4 C	5,2	5,8	5,7	4,8	5,2	6,6	5,9	6,3	7,0	6,7	2,20a
	37 C	5,4	5,4	6,5	7,0	7,4	7,1	6,5	7,0	7,1	7,8	
BCF (Hz)	4 C	22,9	26,8	26,8	30,2	27,8	25,6	26,4	26,2	25,6	24,1	1,33
	37 C	29,1	28,0	26,4	26,5	23,8	24,5	20,2	22,4	21,0	21,7	
LIN (%)	4 C	53,0	53,0	53,0	59,0	58,0	50,0	53,0	51,0	47,0	45,0	1,78
	37 C	56,0	57,0	48,0	49,0	46,0	45,0	50,0	47,0	46,0	42,0	
MOTILIDADE (%)	4 C	48,0	42,0	30,0	53,0	35,0	40,0	35,0	29,0	56,0	50,0	1,36
	37 C	60,0	45,0	74,0	64,0	49,0	68,0	33,0	34,0	45,0	41,0	
MOTILIDADE PROGRESSIVA (%)	4 C	26,0	29,0	21,0	33,0	26,0	25,0	25,0	20,0	34,0	25,0	0,91
	37 C	41,0	32,0	46,0	43,0	31,0	41,0	19,0	20,0	25,0	22,0	
STR (%)	4 C	83,0	85,0	84,0	88,0	87,0	80,0	85,0	83,0	80,0	75,0	1,70
	37 C	86,0	88,0	80,0	81,0	79,0	78,0	79,0	79,0	77,0	74,0	
VAP ($\mu\text{m/s}$)	4 C	61,5	66,2	68,7	64,8	73,6	77,9	71,5	73,0	74,2	69,2	2,54a
	37 C	71,8	68,1	74,4	86,2	86,9	83,6	82,6	80,1	73,0	75,4	
VCL ($\mu\text{m/s}$)	4 C	97,2	110,7	114,4	100,4	114,4	128,7	120,3	121,4	128,6	120,1	2,69a
	37 C	114,6	108,8	130,1	150,4	156,1	149,9	140,4	145,9	128,6	141,2	
VSL ($\mu\text{m/s}$)	4 C	50,8	56,6	57,7	57,2	64,7	63,5	61,4	61,6	60,0	52,4	1,33
	37 C	62	60,2	59,3	69,5	67,3	64,5	64,6	61,6	56,1	54,5	

a - 37°C superior (α bicaudal: 0,05)

b - 4°C superior (α bicaudal: 0,05)

Tabela 4 - Resultados (α bicaudal: 0,05) obtidos por microscopia de fluorescência (peanut agglutinin/isotiocinato de fluoresceína/iodeto de propídeo) comparando a integridade de membranas plasmática e acrossomal de espermatozoides de amostras de sêmen do touro da raça Girolando, descongelados sob temperaturas de 4°C e 37°C, nos momentos imediato, 1, 2, 3 e 4 horas após respectivos descongelamentos.

Parâmetros	Descongelamento a	Imediato		Após 1 hora		Após 2 horas		Após 3 horas		Após 4 horas		$Z_{cal} = \frac{\mu - \mu(u)}{\sigma(u)}$
		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	
ICRA (%)	4 C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
	37 C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
ISRA (%)	4 C	39,0	19,0	30,0	29,0	28,0	19,0	27,0	27,0	36,0	29,0	2,23b
	37 C	16,0	21,0	16,0	39,0	27,0	23,0	14,0	23,0	11,0	26,0	
LCRA (%)	4 C	27,0	40,0	24,0	36,0	25,0	23,0	29,0	44,0	32,0	40,0	2,42a
	37 C	35,0	47,0	35,0	31,0	38,0	44,0	68,0	44,0	41,0	52,0	
LSRA (%)	4 C	34,0	41,0	46,0	35,0	47,0	58,0	45,0	29,0	32,0	31,0	1,10
	37 C	49,0	32,0	34,0	30,0	35,0	33,0	18,0	33,0	48,0	22,0	

a - 37°C superior (α bicaudal: 0,05)

b - 4°C superior (α bicaudal: 0,05)

Houve diferença significativa (α bicaudal: 0,05) nos parâmetros ALH, VAP, VCL, LCRA (37°C superior) e ICRA (4°C superior).

Os resultados das análises das amostras de sêmen do animal da raça Nelore encontram-se nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Resultados (α bicaudal: 0,05) obtidos pelo sistema CASA (computer-aided sperm analysis, IVOS II Hamilton Thorne) comparando a cinética de amostras de sêmen do touro da raça Nelore, descongeladas sob temperaturas de 4°C e 37°C, nos momentos imediato, 1, 2, 3 e 4 horas após respectivos descongelamentos.

Parâmetros	Descongelamento a	Imediato		Após 1 hora		Após 2 horas		Após 3 horas		Após 4 horas		$Z_{cal} = \frac{\mu - \mu(u)}{\sigma(u)}$
		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	
ALH (μm)	4 C	7,8	7,7	7,0	7,7	7,5	7,8	8,0	7,5	7,8	7,7	1,33
	37 C	8,2	8,4	8,2	7,8	8,1	7,9	7,5	7,9	6,1	6,8	
BCF (Hz)	4 C	24,5	23,6	23,6	23,8	23,3	23,4	22,0	23,9	23,4	22,6	0,08
	37 C	22,8	21,7	24,2	24,0	24,0	23,8	23,5	23,6	22,0	22,4	
LIN (%)	4 C	34,0	35,0	34,0	34,0	33,0	32,0	34,0	34,0	35,0	35,0	3,14a
	37 C	37,0	35,0	36,0	39,0	37,0	35,0	34,0	38,0	39,0	40,0	
MOTILIDADE (%)	4 C	61,0	64,0	66,0	66,0	59,0	60,0	60,0	59,0	56,0	68,0	0,83
	37 C	69,0	72,0	68,0	67,0	65,0	53,0	46,0	77,0	47,0	61,0	
MOTILIDADE PROGRESSIVA (%)	4 C	18,0	20,0	17,0	19,0	16,0	15,0	17,0	19,0	21,0	26,0	2,2a
	37 C	31,0	29,0	29,0	29,0	28,0	20,0	17,0	34,0	14,0	21,0	
STR (%)	4 C	61,0	61,0	58,0	60,0	59,0	56,0	59,0	60,0	62,0	63,0	3,71a
	37 C	66,0	64,0	66,0	68,0	66,0	63,0	63,0	66,0	68,0	69,0	
VAP ($\mu\text{m/s}$)	4 C	79,6	88,0	93,9	86,4	85,2	94,1	91,3	84,4	85,8	84,0	1,29
	37 C	96,4	88,7	97,5	85,7	94,9	94,9	87,9	98,1	67,4	69,8	
VCL ($\mu\text{m/s}$)	4 C	148,2	160,9	162,8	156,8	156,9	169,8	163,0	154,3	158,3	154,0	1,74
	37 C	177,1	163,8	182,9	157,2	174,8	184,1	169,1	180,7	123,1	126,4	
VSL ($\mu\text{m/s}$)	4 C	49,0	53,9	55,0	51,5	50,3	52,1	54,2	49,9	53,0	53,3	2,08
	37 C	63,4	56,9	64	57,9	62,5	58,7	53,9	64,4	43,8	47,4	

a - 37°C superior (α bicaudal: 0,05)

b - 4°C superior (α bicaudal: 0,05)

Tabela 6 - Resultados (α bicaudal: 0,05) obtidos por microscopia de fluorescência (peanut agglutinin/isotiocinato de fluoresceína/iodeto de propídeo) comparando a integridade de membranas plasmática e acrossomal de espermatozoides de amostras de sêmen do touro da raça Nelore, descongelados sob temperaturas de 4°C e 37°C, nos momentos imediato, 1, 2, 3 e 4 horas após respectivos descongelamentos.

Parâmetros	Descongelamento a	Imediato		Após 1 hora		Após 2 horas		Após 3 horas		Após 4 horas		$Z_{cal} = \frac{\mu - \mu(u)}{\sigma(u)}$
		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	
ICRA (%)	4 C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,38
	37 C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	
ISRA (%)	4 C	23,5	22,5	24,0	35,5	16,5	21,0	32,0	39,0	13,5	20,0	1,59
	37 C	24,0	28,0	9,0	7,5	22,0	19,0	17,5	17,0	20,0	20,5	
LCRA (%)	4 C	50,0	44,5	37,5	38,5	45,0	42,5	44,0	24,0	41,5	45,0	0,64
	37 C	42,5	38,0	42,0	48,5	39,5	59,0	38,0	50,0	42,5	53,5	
LSRA (%)	4 C	26,5	33,0	38,5	26,0	38,5	36,5	24,0	32,0	45,0	35,0	0,64
	37 C	33,5	34,0	49,0	44,0	38,5	22,0	44,5	33,0	37,5	25,5	

a - 37°C superior (α bicaudal: 0,05)

b - 4°C superior (α bicaudal: 0,05)

Houve diferença significativa (α bicaudal: 0,05) nos parâmetros LIN, MOTILIDADE PROGRESSIVA e STR, sendo em todos o descongelamento a 37°C superior.

O sêmen do touro da raça Red Angus apresentou menor variação entre os dois tratamentos, indo de acordo com os resultados de ANCHIETA et al. (2005), trabalho em que o sêmen de touros de raças taurinas se mostrou mais viável, após o descongelamento, do que o de raças zebuínas.

O sêmen do animal da raça Girolando apresentou grandes variações na avaliação da integridade de membrana, tanto no parâmetro ISRA, como no parâmetro LSRA. Entretanto o parâmetro LCRA (membrana plasmática lesada e acrossoma reagido), que foi superior (α bicaudal: 0,05) no descongelamento a 37°C, indica danos aos espermatozoides e, nesse caso, o descongelamento a 4°C se mostrou melhor. Esses resultados sugerem que o descongelamento e a manutenção por até quatro horas do sêmen sob a temperatura de 4°C protegeram as membranas plasmática e acrossomal de danos que ocorreram sob a temperatura de 37°C.

Os resultados encontrados divergem do trabalho de AL-BADRY (2012), onde o sêmen de touro da raça Holstein-Friesian descongelado a 5°C obteve índices de motilidade e integridade acrossomal bem inferiores aos descongelados a 37 e 60°C.

A viabilidade do sêmen ao longo do tempo mostrou-se preservada em ambos os tratamentos, divergindo de PACE & MICHAEL (2002), onde é citado que o sêmen se

deteriora rapidamente quando não depositado no trato reprodutivo feminino dentro de quinze minutos após seu descongelamento.

2.4. CONCLUSÃO

Através deste trabalho, pôde-se sugerir que o sêmen de touros se mostra viável por até quatro horas após o descongelamento em temperaturas de 4°C e de 37°C. Assim pode ser criada uma alternativa para o transporte de sêmen criopreservado por pequenas distâncias sem a necessidade do transporte de botijões de nitrogênio líquido. Outros trabalhos que envolvam um maior número de amostras de sêmen para cada tratamento e a inseminação de um grande número de vacas devem ser realizados, pois assim poderá ser analisada a distribuição dos resultados, podendo-se utilizar ensaios estatísticos paramétricos.

3. REFERÊNCIAS

- AL-BADRY, K. I. *Effect of Various Thawing Times and Temperatures on Frozen Semen Quality of Friesian Bulls in Iraq*. International Journal of Animal and Veterinary Advances 4(6): 384-388, 2012.
- ANCHIETA, M.C.; VALE FILHO, V.R.; COLOSIMO, E.; SAMPAIO, I.B.M.; ANDRADE, V.J. *Descarte e congelabilidade do sêmen de touros de raças zebuínas e taurinas em central de inseminação artificial no Brasil*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. vol.57 no.2 Belo Horizonte Apr. 2005.
- Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA). 2013. *INDEX ASBIA 2012*. Disponível em <http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/index2012.pdf>
- BAILEY, J. L.; BILODEAU, J. F.; CORMIER, N. *Semen Cryopreservation in Minireview Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon*. Journal of Andrology, Vol. 21, No. 1, January/February 2000.
- BARBOSA, R. T.; MACHADO, R. *Panorama da inseminação artificial em bovinos* [Recurso eletrônico] - Dados eletrônicos. — São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008.
- BERNDTSON, W.E.; PICKETT, B.W, RUGG, C.D.; *Procedures for field handling of bovine semen in plastic straws*. Proc of the Sixth Technical Conf on AI and Reproduction: PP 51-58, NAAB, 1976.
- BRAGA, G. B. *Caracterização dos sistemas de criação de bovinos em idade reprodutiva e estimativa da prevalência de brucelose bovina na região centro-sul do Brasil*. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal. São Paulo, 2010.

BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D.; BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P. L.; KASTELIC, J. P. *Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate*. 2003 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/S0093-691X(03)00174-2

BROWN JR, D. W.; SENGER, P. L.; BECKER, W. C. *Effect of group thawing on post-thaw viability of bovine spermatozoa packaged in .5-milliliter French straws*. J Anim Sci 1991, 69:2303-2309.

BRUNI, A. L. *Estatística aplicada à gestão empresarial/ Adriano Leal Bruni*. – São Paulo: Atals, 2007, p. 263 – 266.

CARVALHO, J.O. *Avaliação da qualidade do espermatozoide bovino criopreservado após sexagem por citometria de fluxo e sua utilização na produção in vitro de embriões*. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 91p. Dissertação de Mestrado.

CELEGHINI, E. C. C.; DE ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F. C.; NESCIAMENTO, J; RAPHAEL, C. F. *Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrosomal and Mitochondrial Membranes*. Reprod Dom Anim 42, 479–488 (2007); doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00810.x ISSN 0936-6768.

DA COSTA, L. B. *A bovinocultura de corte (ciclo completo) e sua economicidade : um estudo de multicaso*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, RS, 2006.

FERRAZ, J. B. S.; ELER, J. P.; REZENDE, F. M. *Impacto do uso de inseminação artificial na multiplicação de bovinos de corte alto mérito genético no Brasil*, 2013.

GONZALEZ, R. A. F. *Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade da membrana do espermatozoide bovino*. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal. Pirassununga, 2004.

Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA). *Listagem com dados sobre a área total (em hectares) e número de imóveis cadastrados em todo o Brasil*. 26 de abril de 2012. Disponível em: <http://www.incra.gov.br/index.php/estrutura-fundiaria/regularizacao-fundiaria/estatisticas-cadastrais/file/1250-relacao-total-de-imoveis-rurais-brasil-abril-2012> .

KACZYK, B. L. *A Comparasion of semen thawing for artificial insemination in cattle*. Mir Center, Angelo State University, San Angelo, Texas, May 2011.

MARCUSSI, C. *Iseminação artificial em tempo fixo*. Trabalho monográfico do curso de pós-graduação "Lato Sensu" em Produção e Reprodução de Bovinos apresentado à UCB como requisito parcial para a obtenção de título de Especialista em Produção e Reprodução Bovina. Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, out. 2006.

MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G. ; TONIOLLI, R. *Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura*. Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.225-232, out./dez. 2008.

MORTIMER, S.T. *A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals*. Human Reproduction Update 1997, Vol. 3, No. 5 pp. 403–439.

MORTIMER, S.T. *CASA—Practical Aspects*. Genesis Fertility Centre, Vancouver, Canada, February 29, 2000.

MPHAPHATHI, M. L.; LUSEBA, D.; SUTHERLAND, B.; NEDAMBALE, T. L. *Comparison of slow freezing and vitrification methods for Venda cockerel's spermatozoa*. Open Journal of Animal Sciences, Vol.2, No.3, 204-210 (2012).

NASCIMENTO, E. F.; DA COSTA, L. F.; MOUSTACAS, V. S.; SANTOS, R. L. *Doenças de reprodução de bovinos de corte: o programa preventivo e controle sanitário*. VII SIMCORTE, 2008. Disponível em: http://www.simcorte.com/index/Palestras/7_simcorte/simcorte19.pdf

NETO, J. O. C.; DODE, M. A. N. *Técnica de coloração com peanutaagglutinin (PNA)-isoticionato de fluoresceína (FITC) para a avaliação da integridade do acrossoma de espermatozoides bovinos*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010.

Núcleo de Estudos Agrários e Desenvolvimento Rural/ Ministério do Desenvolvimento Agrário – MDA – *Estatísticas do Meio Rural 2010 – 2011*, disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/110531890/Estatistica-do-Meio-Rural-2010-2011>.

PACE, M.; MICHAEL, N. *Dispelling the myths of artificial incemination*. ABS Global. 2002 Disponível em: http://usa.absglobal.com/tech_serv/resources/resourcefiles/dairy/AIArticle.pdf

SILVA, P. N. F.; GADELLA, B. M. *Detection of damage in mammalian sperm cells*. 2005 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.010.

STROUD, B. *Consequences of mishandling frozen semen and embryos*. Stroud Veterinary Embryo Services Inc, Weatherford, Texas, December 3-4, 2012.